Aus der Chem. Abt. des Pathologischen Instituts der Universität
(Charité-Krankenhaus)
Direktor: Prof. Dr. Rössle
Leiter: Prof. Dr. K. Hinsberg

Modellversuche zur Ausarbeitung einer neuen Bestimmungsmethode für Vitamin C

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der
Medizinischen Doktorwürde
an der
Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin

vorgelegt von
Seymour Goldstein
aus New York

Tag der Promotion: 14. Juni 1938

Druck: Paul Brandel, Berlin SO 16

M 105

Gedruckt mit Genehmigung
der
Medizinischen Fakultät der Universität Berlin.
Dekan: Prof. Dr. R. Siebeck.
Referent: Geheimrat Prof. Dr. Rössle.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Meinen lieben Eltern gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543925_0150

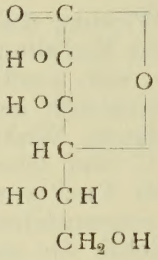
Die antiskorbutische Wirkung des Vitamin C war lange bekannt, bevor seine chemische Konstitution ermittelt war. Nachdem diese einwandfrei bewiesen war, wurde das Vitamin C bald von der Industrie synthetisch hergestellt und steht heute zu klinischen Zwecken wohlfeil zur Verfügung. Wichtiger als die antiskorbutische Eigenschaft des Vitamin C sind seine sonstigen therapeutischen Wirkungen. Smith und Mc Conkey wiesen im Jahre 1933 nach, daß Meerschweinchen mit ausgesprochenem Vitamin C-Mangel Magengeschwüre bekamen, ähnlich wie sie beim Menschen auftreten. Von 75 Meerschweinchen, die auf Vitamin C-Mangeldiät gesetzt waren, trat bei 26% der Tiere Ulcusbildung auf. Von 80 Tieren, die neben derselben Mangeldiät keine Zulagen von synthetischem Vitamin C erhielten, fand sich nur in einem Falle Ulcus-Bildung. Postmortale Untersuchungen von 1000 Meerschweinchen ergaben in keinem Falle spontanen Ulcus.

Bei Infektionskrankheiten wie Pneumonie, Cystitis, Typhus abdominalis und Tuberkulose ist der Bedarf des Organismus an Vitamin C erheblich gesteigert. Schröder hat dies nachgewiesen bei Patienten mit den genannten Krankheiten und auch bei Diabetes und Krebs. Stepp zeigte, daß bei vielen Fällen von Hypovitaminose der Organismus unfähig ist, Vitamin C zu resorbieren. So ist z. B. bei Gastro-enteritis infolge der beschleunigten Peristaltik des Dünndarms die Vitaminresorption herabgesetzt. Nach Stepp und Schröder kann auch das Vitamin C durch Darmbakterien der Coligruppe und des Paratyphus B zerstört werden, wodurch dann eine Hypovitaminose entsteht.

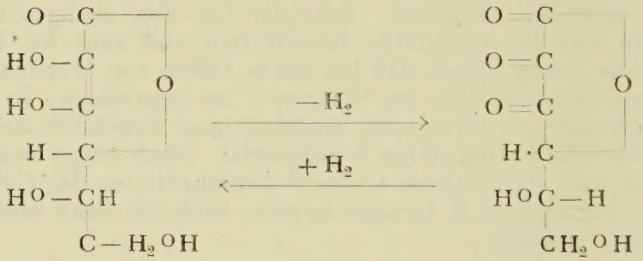
Über die therapeutischen Wirkungen des Vitamin C bestehen heute wohl kaum noch Zweifel. Böger und Schröder beschreiben Fälle, wo sie durch intravenöse Injektion von Vitamin C bei Morbus Werlhoff, bei Purpura hämorrhagia und Hämophylie schnelle Erfolge erzielten. Kreitmair berichtet, daß Vitamin C regenerierend auf das anämische Blutbild wirkt, nachgewiesen an Katzen. Die Pigmentation des Morbus Addison verschwindet vollständig nach intravenöser Applikation von Vitamin C. Diese Erscheinung wurde zuerst beobachtet von Szent-Györgi und später bestätigt von Morawitz, Szyle und v. Teuben.

Seit es Szent-Györgi gelungen war, das Vitamin C zu isolieren das er Hexuronsäure nannte, sind zahlreiche Versuche unternommen worden, eine spezifische Methode zu finden, um das Vitamin in den Organen und Säften des menschlichen Körpers quantitativ zu bestimmen. Bevor auf diese Methoden eingegangen wird, ist eine kurze Beschreibung der chemischen und physikalischen Eigenschaften dieses Vitamins angebracht. Ascorbinsäure, wie das Vitamin C gewöhnlich genannt wird, kommt im Tier- und Pflanzenreich

in zwei Formen vor, in der d- und l-Form. Nur die l-Ascorbinsäure besitzt die aktiven Eigenschaften des Vitamins und hat folgende Konstitution:



Die l-Ascorbinsäure ist leicht löslich in Wasser, weniger in Methylalkohol und abs. Äthylalkohol. Eine wässrige Lösung von l-Ascorbinsäure ist an der Luft wenig haltbar, da sie zu Dehydroascorbinsäure oxydiert wird. Diese Dehydroascorbinsäure kann in die l-Ascorbinsäure zurückverwandelt werden durch Reduktion mit Schwefelwasserstoff. Diese reversiblen Vorgänge werden durch die folgenden Formeln veranschaulicht:



Ascorbinsäure hat stark reduzierende Eigenschaften. In saurem Medium reduziert sie 2 Atome Jod zu Jodwasserstoff, Silbernitrat zu metallischem Silber, Chinon zu Hydrochinon usw. Auf dieser Reduktionsfähigkeit gründeten zuerst Tillmanns und Hirsh eine Bestimmungsmethode für Vitamin C.

Weiterhin sind noch viele Methoden zur quantitativen Bestimmung der Ascorbinsäure in den verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten beschrieben worden. Keine dieser Methoden kann jedoch als spezifisch für Vitamin C angesprochen werden. Tillmanns Methode, obwohl die älteste, wird heute noch am meisten benutzt. Sie beruht auf der Eigenschaft der Ascorbinsäure, den Farbstoff 2,6-Dichlorphenolindophenol zu reduzieren. Modifikationen dieser Methode sind zahlreich. Ursprünglich wurde die Titration im neutralen Medium durchgeführt. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß sich dann zu hohe Werte ergaben. Die Abänderung der Methode von Harris und Ray ist wohl die beste von allen. Sie arbeiten in saurem Medium bei einem pH von 2.5—3. Anstatt die Ascorbinsäure

mit dem Farbstoff zu titrieren, legen sie umgekehrt eine gemessene Menge des Farbstoffs vor und titrieren diesen mit einer Ascorbinsäurelösung, weil so der Umschlag besser zu erkennen ist. Auf diese Weise bestimmen sie aus dem Gehalt einer bekannten Ascorbinsäurelösung den Titrationswert des Farbstoffes. Nachdem sie diesen Wert ermittelt haben, benutzen sie ihn zur quantitativen Bestimmung in Organextrakten, indem sie mit diesen Extrakten den Farbstoff titrieren. Auch diese Methode ist noch unspezifisch, denn es hat sich gezeigt, daß auch so Substanzen wie Glutathion, Cystein, Ergothionein, Thiosulfat u. a. imstande sind, 2,6-Dichlorphenolindophenol in neutralem Medium zu reduzieren. Durch Arbeiten im saurem Medium bei einem pH von 2.5—3 wird die Wirkung von Glutathion und Cystein größtenteils ausgeschaltet. Da die Dehydroascorbinsäure nicht die reduzierenden Eigenschaften der Ascorbinsäure besitzt, wird sie bei der Tillmannschen Methode nicht mit erfaßt. Um die Dehydroascorbinsäure, die gleichen therapeutischen Wert hat, zu bestimmen, muß sie erst mit Schwefelwasserstoff zur Ascorbinsäure reduziert werden.

Ascorbinsäure kann auch quantitativ bestimmt werden durch Jodtitration. In Organextrakten ergibt die Methode meist erheblich höhere Werte als die Tillmannsche. Kühnau hat zwar gezeigt, daß durch Zusatz von Kaliumjodid die Werte etwas erniedrigt werden. Dies beweist, daß das Kaliumjodid die Wirkung einiger anderer reduzierender Substanzen vermindert. Die Wirkung von Cystein und Glutation als jodreduzierende Stoffe wird jedoch nicht durch Kaliumjodid ausgeschaltet. Diese Methode muß daher als die am wenigsten spezifische betrachtet werden.

Die Methylenblaumethode von Martini und Bonsignore erhebt Anspruch darauf, die niedrigsten Werte bei Bestimmung der Ascorbinsäure in Organextrakten oder Körperflüssigkeiten zu liefern. Diese Methode beruht gleichfalls auf der Reduktion kraft der Ascorbinsäure, sie entfärbt nämlich bei starker Belichtung schnell eine wässrige Lösung von Methylenblau. Diese Methode erfaßt ebenfalls nicht die vorhandene Dehydroascorbinsäure. Außerdem hat Neuweiler nachgewiesen, daß mit Änderung der Wasserstoffionenkonzentration auch der Methylenblauverbrauch sich stark ändert. Wachholder hat gezeigt, daß die Entfärbung des Methylenblaus auch von der Stärke der Belichtung abhängt. All diese Faktoren machen diese Methode unsicher.

Die kolorimetrische Methode von Bezssonoff mit Phosphormolybdänwolframräure ist gleichfalls unspezifisch, da Substanzen wie Hydrochinon, Glucoreducton, Katechin, Chinhydron, Brenzkatechin usw. und wohl auch noch unbekannte biologisch vorkommende Stoffe ebenfalls positive Reaktion geben.

Taubers Methode, nach welcher die Ascorbinsäure durch Ferricyanid in saurer Lösung oxydiert wird, und das entstandene Ferrocyanid kolorimetrisch bestimmt wird, kann abgelehnt werden, da

auch Substanzen wie Pyrogallol, Cystein, Glutathion und Tanin die gleiche Reaktion geben.

Die kolorimetrische Methode von Fujita, Iwatake und Miyata, nach welcher eine Standardlösung von Ascorbinsäure in 2% meta-Phosphorsäure und Wolframsäure mit einer Lösung, welche die zu bestimmende unbekannte Menge Ascorbinsäure enthält, verglichen wird, wird im Schrifttum ebenso abgelehnt. Fujita und Ebihara haben durch Messungen im Pulfrich-Photometer die erhaltene Färbung als unbeständig nachgewiesen. Nach denselben Autoren stört auch die Anwesenheit von Adrenalin die Reaktion.

Eine quantitative Bestimmung mit Phosphor — 18 — Wolframsäure ist beschrieben von Laporta, Yamamoto, Medes und Wacholder. Medes wendet die Mthode auf Urin an bei pH 5. Bei höherem pH ist die Reaktion gestört. Nach Fujita und Ebihara geben die gleiche positive Reaktion auch Stoffe wie Glucoreducton, Brenzkatechin, Pyrogallol, Hydrochin, Dioxyaceton, Taninsäure, Phenylhydrazin, Natriumhydrosulfit, Methylglyoxal, Ferrosulfat u. a.

Versuche, nach einer spezifischen Methode Vitamin C wenigstens zu isolieren, haben Hinsberg und Ammon beschrieben. Sie fällen die Ascorbinsäure nach Oxydation zur Dehydroascorbinsäure mit 2,4-Dinitrophenylhydrazon als Osazon, ähnlich wie Kotake mit Phenylhydrazin das „Vitamosazon" hergestellt hat. Da die Modellversuche, welche ich im folgenden beschreibe, auf der gleichen Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin beruhen, erscheint es angebracht, auf die Einzelheiten der Methode von Hinsberg und Ammon näher einzugehen.

Sie zeigten in einer Reihe von Versuchen, daß eine quantitative Fällung von Ascorbinsäure mit Phenylhydrazin nicht erzielt werden kann. Wenn jedoch an Stelle von Phenylhydrazin 2,4-Dinitrophenylhydrazin benutzt wird, ist eine 100%-Ausfällung möglich. Der Versuch wurde in folgender Weise angestellt: Zu 500 ccm Wasser wurden 90 ccm einer 2n (7%) Salzsäure und 50 mg Ascorbinsäure gegeben. Nach Oxydation mit 6.7 ccm einer ca n/10 Jodlösung wurde 1 gr 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in 100 ccm 7% Salzsäure zugesetzt und die Mischung 4 Tage im Brutschrank bei 39° stehen gelassen. Dann wurde filtriert, mit 7% Salzsäure gewaschen und getrocknet. Gefunden wurden 165 mg Osazon oder 100% der theoretischen Ausbeute. Ich habe bei diesem Versuch wiederholt und retischen Ausbeute. Sie haben bei diesem Versuch wiederholt und genau das gleiche Resultat erhalten.

Hinsberg und Ammon versuchten weiter, das Vitamin C aus normalem Urin zu isolieren. Nach Fällung des Urins mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin, suchten sie die anderen mitausgefallenen Osazone oder Hydrazone abzutrennen. Sie wuschsen die Fällung mehrmals mit Alkohol von 0°, bis das Filtrat farblos war, und dann in gleicher Weise mit Oxalester. Das Vitamin C Osazon ist unter diesen Bedingungen so gut wie unlöslich. Danach lösten sie den Rückstand in warmem Oxalester und erhielten nach Abkühlen der

Lösung eine geringe Menge kristallisiertes Vitaminosazon, dessen Reinheit durch Schmelzpunkt und Drehungsvermögen geprüft wurde. Das „Vitamosazon" hat einen Schm. von 271—273° und eine spez. Drehung $\alpha D = +211—231°$ in Pyridin-Eisessig. Die Drehung nimmt beim Stehen der Lösung sehr schnell ab. Bei Wiederholung dieses Versuches fand ich, daß das Vitaosazon nicht ganz unlöslich ist in Alkohol von 0°, auch verursacht schon geringes Ansteigen der Temperatur bei der Extraktion und beim Waschen einen nicht unbeträchtlichen Verlust durch die Löslichkeit. Das Osazon ist in warmem Alkohol vollständig löslich, desgleichen in warmem Oxalester. Beim Umkristallisieren aus warmem Oxalester entstehen ebenfalls Verluste am Osazon, so daß eine Trennung und quantitative Bestimmung in der oben beschriebenen Weise nicht durchgeführt werden kann.

Auf Veranlassung von Herrn Professor Hinsberg versuchte ich nun eine Methode zu finden, die eine quantitative Abtrennung des Vitaminosazons von anderen in beträchtlichen Mengen mit ausfallenden Osazonen und Hydrazonen ermöglicht. Ich stellte zunächst die Osazone und Hydrazone einer Anzahl von Substanzen her, die im menschlichen Körper vorkommen und von denen bekannt war, daß sie Osazone und Hydrazone bilden. Durch Vergleich ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften mit denen des Vitaminosazons hoffte ich vielleicht einen Weg zu finden, das Vitaminosazon quantitativ abzutrennen. Wie im nachfolgenden Teil der Arbeit ausgeführt, ist es auch gelungen, auf dem vorgesehenen Wege zu einem Erfolg zu kommen.

Die Trennung von Osazonen und Hydrazonen voneinander ist schon von verschiedenen Autoren ausgeführt worden. Simon und Neuberg trennten das 2,4-Dinitrophenylhydrazon des Acetaldehyds vom Osazon des Methylglyoxals und vom Hydrazon der Brenztraubensäure. Ihre Trennungsmethode gleicht der von mir angewandten. Sie benutzten zur Trennung eine Sodalösung, während ich mit einer schwächeren, nur 1% Sodalösung arbeitete. Die genannten Autoren zeigten auch, daß aus der Sodalösung Osazone und Hydrazone wieder mit Salzsäure ausgefällt werden können. Die gleiche Fällungsmethode habe ich auch angewandt.

H. K. Barrenschen und M. Dreguß beschreiben eine Mikromethode zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung von Methylylglyoxal, in biologischem Material. Sie stellen daraus ein Extrakt her und fällen darin enthaltenen Aldehyde und Ketone mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin. Da das Methylglyoxal-bis-hydrazon unlöslich ist in heißem Alkohol, extrahieren sie die löslichen Hydrazone und Osazone mit heißem Alkohol. Das zurückbleibende Methylglyoxal-bis-hydrazon lösen sie dann in alkoholischer Kalilauge, worin es sich mit violetter Farbe löst, und kolorimetrieren dann diese Lösung. Nach demselben Prinzip bestimmt Case die Brenztraubensäure. Diese bekannten Methoden haben mich veranlaßt, nach einem ähnlichen Trennungsverfahren zu suchen.

Es folgt zunächst eine Beschreibung der hergestellten 2,4-Dinitrophenylhydrazone und -osazone unter besonderer Berücksichtigung ihrer Löslichkeit in Alkalien, konzentrierter Schwefelsäure und organischen Lösungsmitteln, und den dabei auftretenden Färbungen. Vergleiche die Zusammenstellung in Tab. 1 1. Glycerinaldehyd. Mol. Gew. 90.05, $C_3H_6O_3$. 205 mg Glcerinaldehyd wurden mit 2 gr 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in 400 ccm heißer 7% Salzsäure, versetzt und diese Mischung im Brutschrank bei 39° aufbewahrt. Nach 4 Tagen wurde abfiltriert und der Rückstand mit 7% Salzsäure und dann mit Wasser gewaschen. Diese Waschungen wurden vorgenommen, um den Überschuß von 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu entfernen. Der getrocknete Niederschlag wog 0.953 gr = 95% der theoretischen Ausbeute. Dies Osazon ist unlöslich in 1% Soda bei 40°. Es zeigt ab 260° Anzeichen von Zersetzung und schmolz bei 272° vollständig unter Zersetzung. Es ist leicht löslich in Pyridin und Natronlauge, aber unlöslich in Wasser. Wenn Wasser und einige Tropfen Natronlauge zu der Pyridinlösung des Osazons gegeben werden, entsteht eine schwache schmutzige Färbung. Wenn statt Wasser Alkohol benutzt wird, ist die Farbe violett. Die Pyridinlösung in Aceton mit einigen Tropfen Natronlauge ergab eine tiefblaue Farbe. In konzentrierter Schwefelsäure löst sich das Osazon mit gelber Farbe.

In der gleichen Weise wurden die Osazone und Hydrazone der folgenden Substanzen hergestellt und untersucht.

2. Glyoxal.
3. Aceton.
4. Acetaldehyd.
5. Brenztraubensäure.
6. Acetessigsäure.
7. Lävulinsäure.
8. Hexosediphosphorsäure.
9. Glucursäure.
10. Glucosamin.
11. Arabinose.
12. Xylose.
13. Maltose.
14. Lactose.
15. Furfurol.
16. Glyoxylsäure.
17. Mesoxylsäure.
18. Glucose.
19. Vitamosazon.

Die wesentlichen Eigenschaften der Osazone bzw. Hydrazone sind in der Tabelle Seite 11 zusammengefaßt. Die Darstellung ergibt prinzipiell nichts Neues. Die Acetessigsäure wurde aus dem käuflichen Ester durch Verseifen bei Zimmertemperatur mit NaOH innerhalb 24 Stunden hergestellt. Das gebildete Na-Salz wurde mit Säure zersetzt und die Acetessigsäure mit Äther extrahiert. Weitere Umsetzung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin wie üblich.

Wie schon früher erwähnt, muß die Ascorbinsäure vor der Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zur Dehydroascorbinsäure oxydiert werden, da nur diese ein Osazon bilden kann. Zur Oxydation der Ascorbinsäure werden in saurer Lösung theoretisch 2 Atome Jod verbraucht. Die Ausbeute an 2,4-Dinitrophenylhysazon beträgt unter den angewandten Bedingungen 100%. Das Osazon ist vollständig löslich in 1% Soda beim leichten Erwärmen auf 30—40°.

Nr.	Stoff:	Ausbeute	Fp.	Löslichkeit in 1% Soda	Löslichkeit in 2% $NaHCO_3$	Reaktion in conc. H_2SO_4	Farbreaktion in Pyridin + NaOH verdünnt mit: H_2O	Alkohol	Aceton	
1.	Glycerinealdehyd	95%	272°	unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	I. Gruppe.
2.	Glyoxal	Spuren	280°	Spuren-lösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
3.	Glucose	40%	230°	unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
4.	Aceton	100%	125°	unlösl.	unlösl.	gelb	rot	rot	rot	
5.	Acetaldehyd	98%	155°	Spuren-lösl.	unlösl.	gelb	rot	rot	rot	
6.	Glucosamin	2%	179°	unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
7.	Arabimose	5%	225°	unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
8.	Lactose	1%		unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
9.	Maltose	1%	210°	unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
10.	Xylose	5%	197°	unlösl.	unlösl.	gelb	violett	violett	violett	
11.	Furfurol	96%	198°	unlösl.	unlösl.	gelb	rot	rot	rot	
12.	Brenztraubensäure	98%	203°	lösl.	lösl.	gelb	rot	rot	rot	II. Gruppe.
13.	Acetessigsäure	58%	102°	lösl.	lösl.	gelb	rot	rot	rot	
14.	Lävulinesäure	86%	204°	lösl.	lösl.	gelb	rot	rot	rot	
15.	Glyoxilsäure	Spuren	185°	lösl.	lösl.	gelb	rot	rot	rot	
16.	Mesoxalsäure	76,5%	200°	lösl.	lösl.	gelb	rot	rot	rot	
17.	Hexosediphosphos-phorsäure	5%	201° 203°	lösl.	Spuren-lösl.	gelb	violett	violett	violett	III. Gruppe.
18.	Glucuronsäure	5%	179°	lösl.	Spuren-lösl.	gelb	violett	violett	violett	
19.	Vitamosazone	100%	271° 273°	lösl.	unlösl.	Blutrot	rot	rot	rot	

Die Temperatur von 40° darf nicht wesentlich überschritten werden, da sonst Verluste an Osazon entstehen. Beim Kochen ändert sich auch die Farbe der Sodalösung, wobei das Osazon schnell zerstört wird. Es ist unlöslich in kalter 2%-Bicarbonatlösung. In wässrigen oder alkoholischem Pyridin gelöst und mit einem Tropfen Natronlauge versetzt, gibt es eine rein rote Farbe, in Aceton-Pyridin gibt es dagegen mit einem Tropfen Natronlauge eine grüne Farbe, wodurch es sich von allen anderen untersuchten Dinitrophenylhydrazinverbindungen unterscheidet. Besonders unterscheidet es sich jedoch durch die blutrote Farbe seiner Lösung in konzentrierter Schwefelsäure.

Kotake hatte schon festgestellt, daß das Phenylosazon der Ascorbinsäure in konzentrierter Schwefelsäure eine organe rote Färbung gibt, im Gegensatz zu Glucosazon, welches in konzentrierter Schwefelsäure schwärzt. Das 2,4-Dinitrophenylvitamosazon gibt dagegen eine blutrote Färbung, während das Glucosazon gelb ist.

Aus der Tab. 1 ist zu ersehen, daß die 2,4-Dinitrophenylhydrazinverbindung der untersuchten Substanzen auf Grund ihrer Löslichkeit in die folgenden Gruppen eingeteilt werden können:

1. Gruppe:

Osazone und Hydrazone, die unlöslich sind in 1% Soda von 40° und 2%Bicarbonat. Hierzu gehören die folgenden Substanzen: Das Osazon der Glucose, Lactose, Maltose, Arabinose und Xylose. Außerdem gehören dazu das Osazon des Glyerinaldehyds und die Hydrazone des Glucosamins.

2. Gruppe:

Diese umfaßt die Hydrazone der Aldo- und Ketosäuren. Hierher gehören die Hydrazone der Brenntraubensäure, der Mesoxalsäure, der Acetessigsäure und der Lävulinsäure. Sie sind löslich in 1% Soda, aber als charakteristisches Merkmal, sind sie löslich in 2% Bicarbonat.

3. Gruppe:

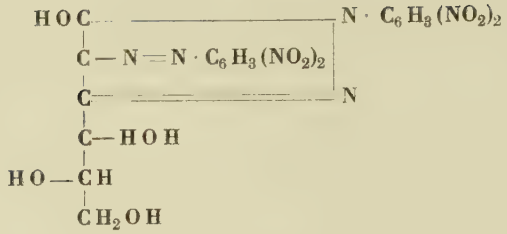
Dazu gehören die Zucker mit einer Carboxyl- oder einer anderen sauren Gruppe. Die Hydrazone dieser Gruppe sind löslich in 1% Soda und praktisch unlöslich in Bicarbonat. Als Beispiele seien angeführt die Hydrazone der Glucuronsäure und der Hexosediphosphorsäure. Die Trennung dieser Gruppe von dem 2,4-Dinitrophenyl-Vitamosazon kann durch Adsorption an Talcum erreicht werden.

Einen ersten Modellversuch zur quantitativen Bestimmung von Vitamin C stellte ich folgendermaßen an. Ein Gemisch der beschriebenen Osazone und Hydrazone wurde zunächst mit 2% Bicarbonat behandelt und filtriert. Das Filtrat enthielt die Gruppe der Hydrazone von Aldo- und Ketosäuren. Um diese vollständig zu entfernen, wurde der Rückstand mit Bicarbonat solange gewaschen, bis das Filtrat nahezu farblos war. Zu dem Rückstand fügte ich 1% Soda-

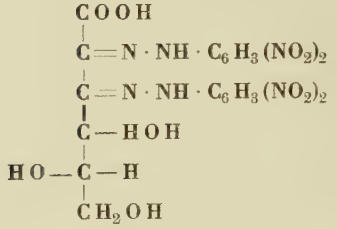
lösung und erhitzte das Gemisch auf dem Wasserbad auf 40° und filtrierte dann. Die Farbe des Filtrates war tiefrot. Es wurde solange mit warmer Sadalösung extrahiert, bis das Filtrat wieder farblos wurde. Auf diese Weise erhielt ich ein Filtrat, welches das Vitamosazon zusammen mit den Hydrazonen der sauren Zucker enthielt, während der Rückstand all die genannten Substanzen, die unlöslich in 1% Soda, sind, enthielt. Zu dem Filtrat wurde 7% Salzsäure gegeben, um die Lösung stark anzusäuern. Sie blieb über Nacht stehen, um eine vollständige Ausfällung des Ssazons zu erreichen. Nach dem Filtrieren wurde der Rückstand wieder mit Wasser gewaschen zur Entfernung der freien Salzsäure. Der Rückstand des Vitamosazons und der sauren Zucker wurde in wenig Pyridin gelöst und 2 ccm 1%Natronlauge zugegeben. Dann versuchte ich, das Vitamosazon von den anderen Osazonen auf chromatographischem Wege zu trennen. Hierfür benutzte ich Glasröhren von etwa 10 mm ∅ gefüllt entweder mit Alumiumhydroxyd oder fein gepulvertem Magnesiumsilicat, die mit alkoholischer Natronlauge eingeschlemmt wurden. Das Adsorptionsmittel zeigte zwei Färbungen, nämlich eine rote und eine violette. Die violette Substanz, die sich unterhalb der roten befand, konnte mit Wasser eluiert werden. Die rote Substanz blieb am Adsorbens haften. Das gleiche Resultat wurde erhalten, wenn ich Alkohol oder Aceton und Natronlauge zu der Pyridinlösung hinzugab.

Es zeigte sich bald, daß das Pyridin entbehrt werden konnte, da mit wässriger Natronlauge als Lösungsmittel das gleiche Ergebnis erzielt wurde. Auch wenn ich reines Vitaminozason allein chromatographierte, fand sich auf dem Adsorbiens ebenfalls die rote und violette Farbe. Hieraus folgt, daß das Vitaminosazan kein einheitliches Produkt war. H. Ohle hat schon festgestellt, daß bei der Reaktion von Ascorbinsäure mit Phenylhydrazin ein Gemisch von wenigstens drei Substanzen entsteht, nämlich das hellgelbe bis-Phenylhydrazon der 2,3-Diketohexonsäure, das rotgefärbte Lacton und das gelbe Glyerylbenzol-azophenylpyrazolon. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß die durch die Chromotographie getrennten Substanzen die von Ohle beschriebenen gleichen. Die Tatsache, daß ich den Schmelzpunkt des Vitaminosazons verschieden fand zwischen 260 und 273°, scheint auch dafür zu sprechen, daß mitunter das Gleichgewicht zwischen den drei möglichen isomeren Substanzen verschoben war und daß in dem Produkt, dessen Schmelzpunkt bestimmt wurde, die eine oder andere Substanz der Menge nach überwog. Wenn ich zur Lösung des Vitamosazons mehr Natronlauge oder konzentrierte Natronlauge anwandte, erhielt ich größere Mengen der violetten Substanz. Ich nehme an, daß die violette Substanz die Pyrazolonform (I.) des Osazons darstellt, während die rote wahrscheinlich das Natriumsalz des bis-Phenylhydrazons der 2,3-Diketohexonsäure (II.) ist.

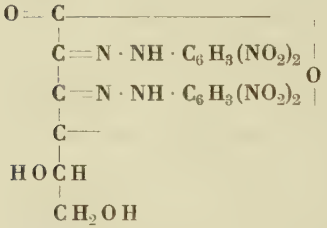
I. Pyrazolon.



II. Säure.



III. Lacton.



Versuche, die Substanzen in ein Gleichgewicht zu bringen, waren ohne Erfolg. Verschiedene Faktoren, wie Temperatur, Konzentration der Natronlauge, Kohlensäuregehalt der Luft, Menge des Absorbens usw. waren störend. Obschon ich feststellen konnte, daß die Pyridinlösung des Osazons, mit Wasser und wenig Natronlauge versetzt, eine stark rote Färbung ergibt, die noch in einer Verdünnung von 1 : 10 000 000 zu erkennen ist, mußte ich doch wegen der beschriebenen Inhomogenität der alkalischen Vitaminosazonlösung diesen Weg zur quantitativen kolorimetrischen Bestimmung verlassen.

Das 2,4-Dinitrophenylvitamosazon ist, wie schon erwähnt, auch leicht löslich in konzentrierter Schwefelsäure und zwar mit blutroter Farbe. Alle anderen hergestellten und beschriebenen Osazone und Hydrazone zeigen in konzentrierter Schwefelsäure eine gelbe Farbe. Auch wird das Vitaminozason in der konzentrierten Schwefelsäure nicht zerstört, denn es konnte durch bloßes Verdünnen der Lösung mit Wasser wiedergewonnen werden. Im Gegensatz zu der alka-

lischen Lösung, die sich innerhalb 24 Stunden schon entfärbte, ist die Farbe der konzentrierten Schwefelsäure lange Zeit beständig. Ich bewahrte z. B. eine solche Lösung drei Tage lang auf und bestimmte täglich die Extinktion kolorimetrisch, wobei ich keine Abnahme in der Farbe und der Menge des Osazons feststellte. Ein besonderer Vorteil der sauren Lösung ist, daß Verunreinigungen durch andere Osazone bei der kolorimetrischen Bestimmung, wenn diese im Stufenphotometer unter Vorschaltung eines passenden Farbfilters vorgenommen wird, nicht stören. Durch Beimischen von Hydrozonen der sauren Zucker bis zu 60% änderte sich der kolorimetrisch gefundene Wert (Extinktion) für das Vitaminosazon nicht, obschon die Farbänderung der Lösung in konzentrierter Schwefelsäure für das bloße Auge beträchtlich ist. Einen weiteren Modellversuch, der die Brauchbarkeit der Methode erweisen sollte, führte ich folgendermaßen durch. Von den beschriebenen Hydrazonen und Osazonen wurden kleine Mengen von 5—12 mg gemischt und dazu 20 mg Vitaminosazon gegeben. Diese Mischung wurde zunächst mit 20% Bicarbonat behandelt und filtriert. Das Filtrat wurde verworfen und der Rückstand mit Bicarbonat gewaschen, bis das Filtrat farblos ablief. Den Rückstand gab ich in ein Becherglas und fügte 40 ccm 1% Soda zu und erwärmte 5 Minuten lang auf 40°. Dies wurde viermal wiederholt, um sicher zu sein, daß die Extraktion vollständig war. Der Rückstand, der die Osazone und Hydrazone der Zucker enthielt, wurde verworfen. Zu dem Filtrat trat, daß neben dem Vitaminosazon noch die Hydrazone der sauren Zucker enthielt, gab ich reichlich 7% Salzsäure. Am anderen Morgen wurde filtriert und die wieder ausgefallenen Substnzen mit Wasser zur Entfernung der Salzsäure gewaschen. Um Verluste beim Ablösen des Rückstandes vom Filterpapier zu vermeiden, löste ich ihn in 50 ccm warmem Alkohol. 10 ccm dieser alkoholischen Lösung wurden in einer Schale verdampft und der Rückstand in 50 ccm konzentrierter Schwefelsäure gelöst. Von dieser schwefelsauren Lösung wurde 1 ccm abpipettiert und mit 4 ccm konzentrierter Schwefelsäure verdünnt. Diese Lösung wurde dann am Stufenphotometer unter Vorschalten des Filters S = 53 kolorimetriert. Dabei erhielt ich die Exetinktion E = 0.77. Nach der vorher aufgenommenen Eichkurve mit reinen Standarlösungen des Vitaminosazons in konzentrierter Schwefelsäure entsprach die gefundene Extinktion 0.77 einer Menge von 97 γ. Von den eingesetzten 20 mg Vitaminosazon wurden also 97 × 50 × 5 = 19,25 mg = 96.25% wiedergefunden. Dann verdünnte ich die Lösung mit konzentrierter Schwefelsäure auf die halbe Konzentration und fand kolorimetrisch E = 0.38, oder 48 γ. Wenn ich zu der zuletzt kolorimetrierten Lösung eine Standardlösung von Vitaminosazon mit mit 40 γ hinzufügte, fand ich die Extinktion E = 0.71 oder 89 γ. Nach Abzug der zugefügten 40 γ bleiben 49 γ oder 97,5%. Diese Resultate können als genügend genau angesehen werden.

Ein anderer Modellversuch wurde nicht mit den fertigen Hydra-

zonen und Osazonen, sondern mit den ursprünglichen Substanzen ausgeführt, um festzustellen, ob damit ein gleich gutes Resultat erhalten würde. Von den folgenden Substanzen nahmen wir je 20 mg.

Glycerinaldehyd, Maltose, Mesoxylsäure, Glyoxal, Arabinose, Xylos, Glucose, Lactose, Lävulinsäure, Hexosediphosphorsäure, Aceton, Furfurol, Acetaldehyd, Glucunsäure, Oxalessigsäure und Brenztraubensäure. Dies Gemisch wurde in Wasser gegeben und mit 5 ccm n/10 Jodsäure oxydiert. Dann wurden zu der Mischung 20 mg Ascorbinsäure gegeben, die vorher durch Oxydation mit 2,3 ccm n/10 Jodlösung zur Dehydroascorbinsäure exydiert worden waren. Zu dem Ganzen wurden dann 3 gr 2,4-Dinitrophenylhydrazin, gelöst in 600 ccm 7% Salzsäure, zugefügt. Nach viertägigem Stehen im Brutschrank bei 39° wurde filtriert und weiter behandelt wie bei den früheren Versuchen beschrieben. Bei diesem Modellversuch waren die Resultate weniger günstig. Anstatt der berechneten 61 mg von Vitaminosazon wurden nur 20,4 mg oder 33,4% wieder gefunden. Dieser hohe Verlust ist wohl so zu erklären, daß beim Arbeiten mit solch aktiven Substanzen, wie ein Gemisch von Aldehyden und Ketonen eine große Menge des Vitamin C zerstört wird. In Organen, wo ein Gleichgewicht zwischen diesen Substanzen besteht, dürfte diese Zerstörung des Vitamins nicht stattfinden. Als weiteren Versuch fügte ich zu der Mischung der vorerwähnten 17 Substanzen nicht die reine Ascorbinsäure, sondern 20 mg fertigen Vitaminosazons um einer Zerstörung vorzubeugen. Der Versuch wurde im übrigen in der gewohnten Weise durchgeführt. Diesmal wurden 98% des Vitaminosazons bei der Kolorimeterie der schwefelsauren Lösung wiedergefunden. Dies beweist, daß das Vitaminosazon bei dem beschriebenen Arbeitsgang nicht zerstört wird.

Figur I zeigt die benutzte Eichkurve für die Standardlösungen von Vitaminasazon in der schwefelsauren Lösung. Die auf der Abszisse aufgetragenen Werte des Vitaminasazons beziehen sich auf 5ccm Lösung, gemessen bei einer Schichtdicke von 10 mm mit Filter S 53. Aus der Kurve ist zu ersehen, daß die Kolorimetrie des Vitaminosazons genau dem Beerschen Gesetz folgt, die Extinktion also direkt proportional der Konzentration ist. Kolorimetriert wurden nur Werte bis 150 γ, weil bei der benutzten Schichtdicke höhere Konzentrationen nicht mehr genügend lichtdurchlässig waren.

Zusammenfassung.

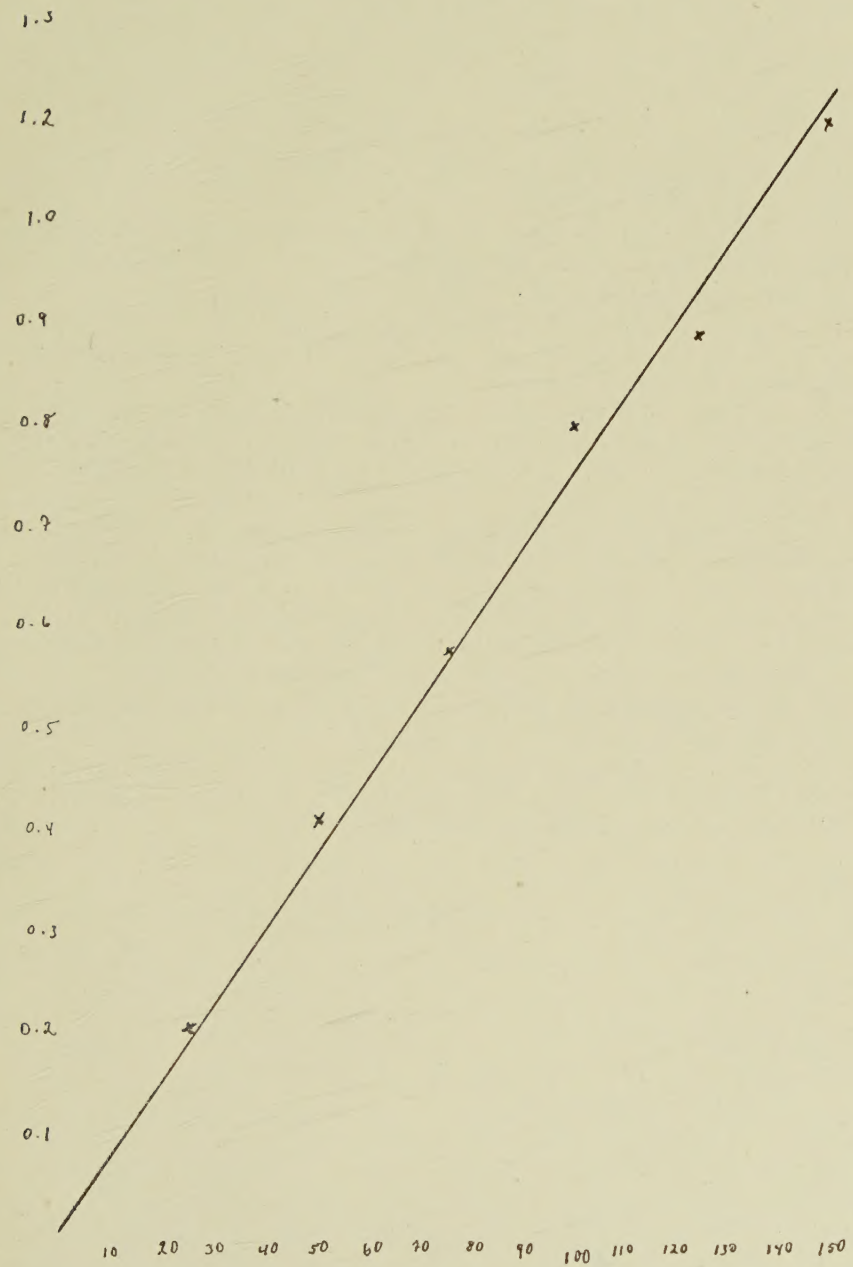
Nach Beschreibung des therapeutischen Wertes und der physikalisch-chemischen Eigenschaften der Ascorbinsäure wurde gezeigt, wie unspezifisch die bisher bekannten Bestimmungsmethoden für das Vitamin C sind. Ich stellte eine Reihe von Osazonen und Hydrazonen her, und verglich sie mit dem Vitaminosation. Die verschiedenen Osazone und Hydrazone wurden in Gruppen eingeteilt und gezeigt, wie die einzelnen Gruppen von dem Vitaminosazon abgetrennt werden können. Die Lösung des Vitaminosazons in konzen-

trierter Schwefelsäure mit roter Farbe erwies sich als beständig und sehr geeignet zur kolorimetrischen Bestimmung.

An dieser Stelle möchte ich dem Herrn Professor Dr. Hinsberg danken für die freundliche Überlassung des Themas der vorliegenden Dissertation.

Des Weiteren ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Dr. Gockel für die tatkräftige Beratung meinen Dank auszusprechen.

E.


1.3
1.2
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120
130
140
150

Lebenslauf.

Ich, Seymour Goldstein, bin am 18. September 1911 in New York geboren.

Nach Beendigung der Volksschule im Jahre 1926 in Brooklyn, New York, habe ich das Eastern District High Scool bezogen und maturierte daselbst im Jahre 1929.

Nach dem Abitur besuchte ich die „Long Island Universität" in Brooklyn, New York, und trieb dort drei Jahre lang Vorstudien für die medizinische Fakultät.

Im Jahre 1932 kam ich nach Deutschland, um hier das medizinische Studium zu vollenden. Zunächst imatrikulierte ich im Winter-Semester 1932 an der „Friedrich-Wilhelm-Universität" zu Bonn am Rhein.

Nach dreisemestrigen Studien, welche ich mit dem ersten Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung (Naturwissenschaften) beendete, kam ich nach Berlin und imatrikulierte hier im Sommer-Semester 1934 an der medizinischen Fakultät der „Friedrich-Wilhelm-Universität" zu Berlin. Im Februar 1935 bestand ich hier den zweiten Abschnitt der ärztlichen Vorprüfung. (Physikum.)

Bisher widmete ich mich den medizinischen Studien, die ich mit der Abschlußprüfung zu vollenden hoffe.

Nach der Promotion zum Dr. med. kehre ich nach meiner Heimat (USA.) zurück, wo ich das an Deutschen Universitäten erworbene Wissen praktisch auswerten will.